

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

04378CTP/H5

(11)Publication number : 11-080026

(43)Date of publication of application : 23.03.1999

(51)Int.Cl.

A61K 45/00
A61K 31/13
A61K 31/135
G01N 33/49

(21)Application number : 09-237273

(71)Applicant : YOSHITOMI PHARMACEUT IND LTD

(22)Date of filing : 02.09.1997

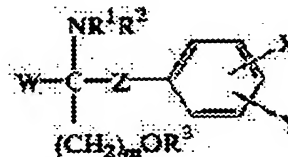
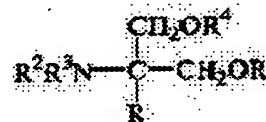
(72)Inventor : CHIBA KENJI
ADACHI KUNITOMO

(54) NEW IMMUNOSUPPRESSANT, ITS USE AND ITS IDENTIFICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject suppressant which is safely usable with low toxicity, can be used together with usual immunosuppressive compounds without adverse drug reactions and is useful for inhibiting the rejection reaction in transplantation and preventing and treating autoimmune diseases by formulating a specific compound which promotes lymphocyte homing toward mesenteries, peripheral lymph tissues or Peyer patches.

SOLUTION: The objective suppressant preferably not inhibiting the production of T-cell interleukin-2 is obtained by particularly formulating 2-aminopropane-1,3-diol, its homolog, analog or derivative, particularly a compound of formula I (R is a carbon chain; R₂-R₅ are each H, an alkyl, etc.), particularly 2-amino-2[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride, or a benzene compound, its homolog, analog or derivative, particularly a compound of formula II [W, R₁, X and Y are each H and the like; Z is a single bond and the like; (m) is 1 and 2; (n) is 2 and 3].



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 01.06.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 1 1 - 8 0 0 2 6

(43) 公開日 平成 11 年 (1999) 3 月 23 日

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号

A 6 1 K 45/00

31/13

A B C

31/135

G 0 1 N 33/49

F I

A 6 1 K 45/00

31/13

A B C

31/135

G 0 1 N 33/49

A

審査請求 未請求 請求項の数 2 2 O L

(全 1 9 頁)

(21) 出願番号 特願平 9 - 237273

(22) 出願日 平成 9 年 (1997) 9 月 2 日

特許法第 30 条第 1 項適用申請有り 1997 年 1 月 発行の「
Drugs of the Future VOL. 2
2 NO. 1」に発表

(71) 出願人 000006725

吉富製薬株式会社

大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号

(72) 発明者 千葉 健治

福岡県築上郡吉富町大字小祝 955 番地 吉
富製薬株式会社医薬研究本部開発研究所内

(72) 発明者 安達 邦知

福岡県築上郡吉富町大字小祝 955 番地 吉
富製薬株式会社医薬研究本部創薬第二研究
所内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

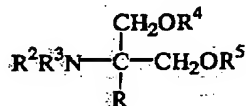
(54) 【発明の名称】 新規免疫抑制剤、その使用方法およびその同定方法

(57) 【要約】

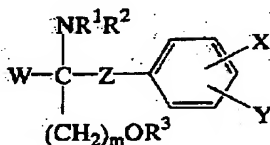
【解決手段】 腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバ
イエル板のいずれかへのリンパ球ホーミングを促進する
作用を有する化合物を有効成分とする免疫抑制剤。該化
合物が 2 - アミノプロパン - 1, 3 - ジオール化合物ま
たはベンゼン化合物である該免疫抑制剤。特に該化合物
が F T Y 7 2 0 である該免疫抑制剤。さらに他の免疫抑
制剤を含有する該免疫抑制剤。

【効果】 本発明の免疫抑制剤は、従来の免疫抑制剤と
は異なる作用機作を有し且つ毒性の副作用が小さいの
で、他の免疫抑制剤と併用することにより、副作用を生
じることなく高い免疫抑制効果を示す。したがって、移
植の拒絶反応、自己免疫疾患などの予防および治療にき
わめて有用である。

【化1】



【化2】



【請求項17】 組織または細胞、特に心臓、皮膚または腎臓組織を移植した非ヒト哺乳動物に試料を投与し、
50 投与後の移植組織または細胞の生存を調べるとともに、

該非ヒト哺乳動物の腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板中のリンパ球に対する血中の循環リンパ球の量比を測定することを含む、該試料中のリンパ球ホーミング促進性の免疫抑制活性の同定方法。

【請求項18】 該非ヒト哺乳動物が齧歯類である請求項17記載の同定方法。

【請求項19】 予め標識されたリンパ球、非ヒト哺乳動物に試料を投与し、投与後の該非ヒト哺乳動物の組織および血液中の該標識リンパ球分布を、該試料を投与していない同系統の非ヒト哺乳動物の組織および血液中の該標識リンパ球分布と比較することを含む、該試料中のリンパ球ホーミング促進活性の同定方法。

【請求項20】 該標識リンパ球がカルセイン標識または遺伝子配列標識されたリンパ球である請求項19記載の同定方法。

【請求項21】 該非ヒト哺乳動物が齧歯類である請求項19または20記載の同定方法。

【請求項22】 リンパ球の輸送を制御するのに有効な量の請求項1〜15記載のいずれかの免疫抑制剤を、リンパ球の輸送を制御する必要のある非ヒト哺乳動物に投与することを含む非ヒト哺乳動物のリンパ球輸送制御方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はリンパ球ホーミング促進作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は該化合物を有効成分とする免疫抑制剤およびリンパ球輸送制御剤に関する。また、本発明はリンパ球ホーミング促進作用を有する化合物を投与することを含む哺乳動物の免疫応答抑制方法およびリンパ球輸送制御方法に関する。さらに、本発明は試料中のリンパ球ホーミング促進活性の同定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 一般に、免疫系はまず抗原提示細胞（APC）を通して抗原をプロセッシングして提示することにより抗原に应答する。過去十年間にわたる精力的な研究の結果、このプロセスに関する分子レベルでの詳細な知識が得られた[Ann. R. Immunol., 12: 259 (1994); Ann. R. cell Biol., 9: 207 (1993); Curr. Opin. Immunol., 7: 69 (1995)]。抗原提示細胞の作用に続いてTリンパ球（T細胞）が活性化され、種々のエフェクター免疫細胞の増殖・分化を誘導する。すなわち、食細胞、ナチュラルキラー細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞および他のエフェクター細胞の活性は、活性化されたT細胞から分泌される化学的メッセンジャーであるサイトカインによってそれぞれ誘導される。

【0003】 一方、免疫応答を抑制する方法の開発は、臓器および細胞移植における拒絶反応を防いだり、種々の自己免疫疾患を治療および予防する上できわめて重要

である。従来より免疫応答の抑制に使用されてきた化合物は、(1) 特定の免疫細胞を攻撃してかかる細胞を免疫系から除去するか、あるいは(2) 免疫細胞がサイトカインに应答する能力を阻害することによって、免疫応答に関わる細胞数を減少させるという作用機作を有するものである。应答する細胞数が少なくなると、免疫系は通常と同様の応答反応を起こすことができなくなり、その結果免疫応答抑制が起こる。

【0004】 具体的には、第一の作用機作を有する化合物群は、免疫細胞中でのヌクレオシド合成を阻害して該細胞の代謝および免疫活性を停止させる。この群には、アザチオプリン[Nature, 183: 1682 (1959)]、ミゾリビン[J. Clin. Invest., 87: 940 (1991)]、ミコフェノール酸[Pharm. Res., 17: 161 (1990)]、ブレキナールナトリウム[Transplantation, 53: 303]が挙げられる。しかしながら、これらの化合物には毒性の副作用を生じるという問題点がある。

【0005】 第二の作用機作を有する化合物群には、シクロスポリンA（CsA）、タクロリムス（TRL）およびラバマイシン[N. Eng. J. Med., 321: 1725 (1989); Transplant. Proc., 23: 2977 (1991)]等がある。CsAは糸状菌トリコデルマ・ポリスポラム（Trichoderma polysporum）から生産される環状ペプチドである[Agents and Actions, 6: 468 (1976); Pharmacological Rev., 41: 259 (1989)]。TRL（別名FK-506）はストレプトマイセス・ツクバエンシス（Streptomyces tsukubaensis）由来のマクロライドである[J. Antibiotics, 40: 1249 (1987); J. Antibiotics, 40: 1256 (1987); Transplantation, 45: 206 (1988)]。これらの化合物は、サイトカインをその合成を妨げることにより除去する。それ故、エフェクター細胞が誘導されず免疫応答は完全に起こらない。一方、ラバマイシンはサイトカインシグナルが免疫細胞に作用するのをブロックする[Transplantation, 52: 185 (1991)]。

【0006】 より詳細には、CsAは抗原刺激を受けたヘルパーT細胞中でのインターロイキン2（IL-2）の産生を阻害することにより免疫応答を抑制する。TRLはヘルパーT細胞中でのIL-2産生を阻害することにより抗原で誘導されるT細胞増殖を阻害する。CsAとTRLはそれぞれシクロフィリンおよびFKBPといわれる2つの異なるタンパク質に結合することによって作用する。結合後、CsA/シクロフィリン複合体とTRL/FKBP複合体はどちらも活性化T細胞中で核因子（NF-AT）を活性化するカルジニユーリンと呼ばれるタンパク質のホスファターゼ活性を阻害する。NF-ATはIL-2遺伝子の転写、したがってIL-2産生を促進する。しかしながら、CsA/シクロフィリン複合体およびTRL/FKBP複合体がNF-ATの活性化を阻害すると、IL-2の産生もまた阻害される。

【0007】 CsAおよびTRLはほとんど同じ作用機

作を有するので、これらの薬剤はまた腎臓および肝臓への毒性などのきわめてよく似た副作用を示す[Lancet, 344:423 (1994)]。そのため両薬剤の併用は避けなければならない。個々の免疫抑制剤の副作用を軽減するために、CsAまたはTRLのいずれかとアザチオプリンやミゾリビン[Transplant. Proc., 17: 1222 (1985); Clin. Transplant., 4: 191 (1990)]のようなステロイド類もしくは他の免疫抑制剤を併用した治療が広く用いられてきたが、必ずしも毒性の副作用を示すことなく十分な免疫抑制効果を発揮するには至っていないのが現状である。

【0008】

【発明が解決すべき課題】したがって、本発明の目的は、それ自体毒性が低く安全に使用できるとともに、副作用を生じることなく従来の免疫抑制化合物と併用できるような、従来の免疫抑制化合物とは全く異なる作用機作を有する免疫抑制化合物を同定し、該化合物を有効成分とする新規免疫抑制剤を提供することである。また、本発明の別の目的は、該免疫抑制剤を免疫応答抑制を必要とする哺乳動物に投与することによる哺乳動物の免疫応答抑制方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、2-アミノプロパン-1, 3-ジオール化合物またはベンゼン化合物、特に2-アミノ-2-[2-(4-オクチルフェニル)エチル]プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩 (FTY720) が、ラットやイヌへの臓器(組織)移植において拒絶反応を顕著に抑制し、移植片の生着率を増大させる効果があることを見出した。さらに、本発明者らは、該化合物が腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板へのリンパ球ホーミングを促進することにより血中の循環リンパ球や脾臓のリンパ球の数を特異的に減少させる作用を有すること、並びに該リンパ球ホーミング促進作用は、該化合物がリンパ節およびバイエル板中の高内皮性細静脈(HEV)細胞に作用して、リンパ球のHEV細胞への接着を促進することによるものであることを確認して本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は以下に示す通りである。

(1) 腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板のいずれかへのリンパ球ホーミングを促進する作用を有する化合物、特に2-アミノプロパン-1, 3-ジオール化合物、ベンゼン化合物、それらのホモログ、それらのアナログおよびそれらの誘導体のいずれか、就中、FTY20を有効成分とする免疫抑制剤。

(2) 臓器、組織、細胞または骨髄移植における拒絶反応を抑制するための上記(1)の免疫抑制剤。

(3) 移植片対宿主反応の予防および治療のための上記

(1)の免疫抑制剤。

(4) 自己免疫疾患、特に関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、花粉症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデスおよび多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1つの自己免疫疾患の予防および治療のための上記(1)の免疫抑制剤。

(5) T細胞におけるIL-2の産生を阻害しないことを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかの免疫抑制剤。

(6) 循環リンパ球を腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板にホーミングさせることにより循環リンパ球数を可逆的に減少させることを特徴とする上記(1)～(5)の免疫抑制剤。

(7) 腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板中の高内皮性細静脈細胞に作用して、循環リンパ球を該高内皮性細静脈細胞に接着させることを特徴とする上記(1)～(6)の免疫抑制剤。

(8) さらに少なくとも1つの他の免疫抑制作用を有する化合物、特にシクロスポリン誘導体またはタクロリムスを含む上記(1)～(7)のいずれかの免疫抑制剤。

(9) 免疫応答を抑制するのに有効な量の上記(1)～(8)のいずれかの免疫抑制剤を、免疫応答を抑制する必要がある哺乳動物に投与することを含む哺乳動物の免疫応答抑制方法。

(10) 組織または細胞、特に心臓、皮膚または腎臓組織を移植した哺乳動物、特に齧歯類に試料を投与し、投与後の移植組織または細胞の生存を調べるとともに、該哺乳動物の腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板中のリンパ球に対する血中の循環リンパ球の量比を測定することを含む、該試料中のリンパ球ホーミング促進性の免疫抑制活性の同定方法。

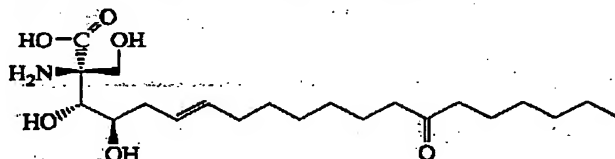
(11) 予め標識されたリンパ球、特にカルセイン標識または遺伝子配列標識されたリンパ球を導入された哺乳動物、特に齧歯類に試料を投与し、投与後の該哺乳動物の組織および血液中の該標識リンパ球分布を、該試料を投与していない同系統の哺乳動物の組織および血液中の該標識リンパ球分布と比較することを含む、該試料中のリンパ球ホーミング促進活性の同定方法。

(12) リンパ球の輸送を制御するのに有効な量の上記(1)～(8)のいずれかの免疫抑制剤を、リンパ球の輸送を制御する必要のある哺乳動物に投与することを含む哺乳動物のリンパ球輸送制御方法。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の免疫抑制剤の有効成分である化合物は、腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板のいずれかへのリンパ球ホーミングを促進することにより免疫応答抑制効果を示す。リンパ球の遊走は通常ランダムと思われるが腸間膜および末梢リンパ節、並びにバイエル板由来のリンパ球には由来器官への帰還性(homing)がある。一般に、細胞接着および細胞表面受容体への結合がリンパ球がどの特定の組織に帰還するか、あるいは血液またはリンパ液中で循環するかを制御

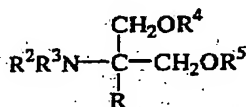
している。あるリンパ球ホーミング受容体、例えばCD 62 L、CD 49 d/β7、CD 11 aおよびそれらのリガンド (GlyCAM-1、MAdCAM-1、ICAM-1等) は、リンパ節の小さな血管である高内皮性細静脈 (HEV) の細胞表面上に発現する。CD 62 L (L-セレクトリン) [Immunity, 1: 247 (1994)] および CD 49 d/β7 (α4 β7 インテグリン) [J. Immunol., 152: 32839 (1994)] は、それぞれリンパ節およびパイエル板 (腸のリンパ組織) 中の HEV 細胞表面に発現されている GlyCAM-1 および MAdCAM-1 に結合する。動物細胞およびリンパ球上にこれらのまたは他の受容体およびリガンドが存在することにより、リン*



【0014】これらの化合物の数多くのホモログ、アナログまたは誘導体がここに引用される文献、特に藤田ら [J. Antibiotics, 47: 216 (1994)] に記載されるような当該技術分野で公知の方法によって調製され得る。本発明においては、ALH免疫抑制化合物は化4で表される2-アミノプロパン-1, 3-ジオール化合物であることが好ましい。

【0015】

【化4】

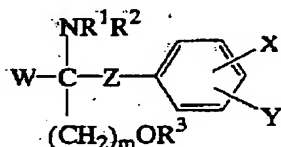


【0016】【式中、Rは任意の置換直鎖または分枝炭素鎖、任意の置換アリール、任意の置換シクロアルキル等；R²、R³、R⁴ および R⁵ は同一または異なり、各々水素、アルキル、アシル、またはアルコキシカルボニルであるか、あるいは R⁴ および R⁵ が結合してアルキレン鎖 (アルキル、アリールまたはアルコキシカルボニルで置換されてもよい) を形成する】

【0017】また、本発明においては、ALH免疫抑制化合物は化5で表されるベンゼン化合物であってもよい。

【0018】

【化5】



【0019】【式中、Wは水素、1~6個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキル、2~6個の炭素原子

*バ球ホーミング過程の基礎が形作られている。本発明の免疫抑制化合物 [以下、リンパ球ホーミング促進性 (accelerated lymphocyte homing) 免疫抑制化合物またはALH免疫抑制化合物と称する場合もある] は、このリンパ球ホーミングという生理学的過程を顕著に促進する活性を有するのである。

【0012】構造的には、ALH免疫抑制化合物のクラスはイサリア・シンクライリイ (Isaria sinclairii) の天然産物であるマイリオシン (化3) またはISP-1から誘導される [J. Antibiotics, 47: 208 (1994)]。

【0013】

【化3】

を有する直鎖または分枝鎖アルケニル、2~6個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキニル、フェニル (ヒドロキシで置換されてもよい)、R⁴ (C H₂)_n、またはハロゲン、シクロアルキルおよびフェニル (ヒドロキシで置換されてもよい) からなる群より選択される1~3の置換基によって置換された直鎖または分枝鎖C₁~C₆アルキル；Xは水素、p個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたは (p-1) 個の炭素原子を有する直鎖アルコキシ (式中、p個の炭素原子を有する直鎖アルキルおよび (p-1) 個の炭素原子を有する直鎖アルコキシは、アルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アルキルアミノ、オキソ、ハロアルキル、ハロゲンおよびフェニル (置換基を有してもよく、置換基を有するフェニルはアルキル、ヒドロキシ、アシル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ハロアルキルおよびハロゲンからなる群より選択される1~3の置換基を有してよい) からなる群より選択される1~3の置換基を有してよい) であり；Yは水素、アルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アシル、アシロキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、ハロアルキルまたはハロゲン；Zは単結合またはq個の炭素原子を有する直鎖アルキレンであり；pとqは同一または異なり、各々1~20の整数 (但し、6 ≤ p + q ≤ 23) であり；mは1, 2または3；nは2または3；R¹およびR² は同一または異なり、各々水素、アルキルまたはアシル；R³ は水素、アルキルまたはアシル；およびR⁴ は水素、アルキルまたはアシルである】

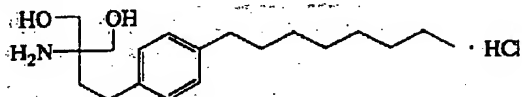
【0020】本発明のALH免疫抑制化合物に含まれる特定の化合物、置換基および変形は米国特許第5,604,229号、ともに係属中の米国特許出願第08/801,390号 (1997年2月20日出願) およびPCT出願PCT/JP95/0

1654号(1995年8月22日出願)に記載される。これらの特許明細書には、本発明に使用し得る特定の化合物の製造および単離方法もまた記載されている。また、ここで引用される文献、特に藤田ら(1995) [BioMed. Chem. Lett., 5: 847]、藤田ら(1996) [J. Med. Chem., 39: 4451]および安達ら(1995) [BioMed. Chem. Lett., 5: 853]にはこれらの化合物の製造方法が記載されている。これらの特許公報および引用文献の各々の全内容はここに引用することによって本明細書の開示に組み込まれる。調製されたホモログ、アナログまたは誘導体がALH免疫抑制活性を有することを確認するための試験方法については後述する。さらに、該化合物は多くの医薬上または生理学上許容され得る塩のいずれかとして調製または単離することができ、あるいは記載されるいずれかの化合物の任意の異性体としても調製され得る。

【0021】本発明において使用されるALH免疫抑制化合物の好ましい構造の一態様としては、化6に示される合成産物FTY720、すなわち、2-アミノ-2-[2-(4-オクチルフェニル)エチル]プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩が挙げられる。

【0022】

【化6】



【0023】ALH免疫抑制化合物は、CsAまたはTRLと異なり、同種抗原刺激されたT細胞におけるIL-2 mRNAの発現およびIL-2の産生を阻害しない。したがって、ALH免疫抑制化合物の使用によりIL-2の産生阻害に起因する不都合な副作用を回避することができる。

【0024】ALH免疫抑制化合物はリンパ球を特定の位置、すなわち腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板にホーミングさせることにより、血液または特定のリンパ組織中の特定のリンパ球、例えば、循環リンパ球や脾臓リンパ球の数を選択的に減少させることができる。このリンパ球ホーミング促進活性は可逆的であるため、治療を一時的に中断すると通常のリンパ球分布に戻る。リンパ球輸送の制御または循環リンパ球の減少によって特定の組織におけるリンパ球の数がコントロールレベルに比べて変化する。後記実施例では、種々の組織および循環血液中のリンパ球数の変化を示すが、実施例における数値は必要とされるリンパ球数の変化の程度を限定するものではない。変化の程度は、哺乳動物の免疫応答において有意な変化を結果として生じるものであればよい。

【0025】リンパ球輸送の制御または特定組織におけるリンパ球レベルの減少は標識したリンパ球を追跡することによって測定することができる。組織局在性、組織

へのリンパ球の巡回頻度または標識リンパ球投与後一定期間でのリンパ球数の変化およびコントロールとの比較から、リンパ球輸送制御またはリンパ球レベルの減少が示される。

【0026】細胞表面受容体や遺伝的修飾を用いてリンパ球ホーミングを制御する方法はこれまでに論じられてきたが、リンパ球ホーミング過程と相互作用する化合物については論じられてこなかった。本発明のALH免疫抑制化合物は、腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板中のHEV細胞に作用して循環リンパ球や特定のリンパ組織のリンパ球をHEV細胞表面上に存在するホーミング受容体と結合させることにより、それらを腸間膜もしくは末梢リンパ組織またはバイエル板に帰還させる。

【0027】ALH免疫抑制化合物は、医薬上許容され得る担体とともに投与することができる。本発明は、ALH免疫抑制化合物および医薬上許容され得る担体を含む免疫抑制剤を提供する。

【0028】本発明の免疫抑制剤は、免疫抑制活性または抗菌活性のような薬理学的活性を有するので、例えば、器官または組織(例えば、心臓、腎臓、肝臓、肺、骨髄、角膜、脾臓、小腸、肢、筋肉、神経、脂肪髄、十二指腸、皮膚または脾臓細胞等、異種移植を含む)の移植に対する抵抗性または移植拒絶反応、骨髄移植による移植片対宿主反応症(GVHD)、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、ネフローゼ症候群、橋本甲状腺腫、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病、II型成人発症型糖尿病、ブドウ膜炎、ステロイド依存性およびステロイド抵抗性ネフローゼ、手足底膿疱症、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎等のような自己免疫疾患および病原微生物による感染症の予防または治療に有用である。

【0029】また、本発明の免疫抑制剤は、乾癬、関節症性乾癬、アトピー性湿疹(アトピー性皮膚炎)、接触性皮膚炎およびさらなる湿疹性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、扁平苔癬、天疱瘡、水疱性類天疱瘡、表皮水疱症、蕁麻疹、血管浮腫、皮膚アレルギー性血管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、ざ瘡、円形脱毛症、好酸球性筋膜炎、並びに粥状硬化症のような炎症性、増殖性および高増殖性の皮膚病および皮膚に現れる免疫原媒介性疾患の予防および治療に有用である。

【0030】さらに、本発明の免疫抑制剤は、脱毛予防、毛髪成長および/または毛髪の発生および成長促進を提供することにより、女性型もしくは男性型脱毛症または老人性脱毛症の治療におけるような毛髪の活力付与に有用である。

【0031】さらに本発明の免疫抑制剤は、呼吸疾患、例えば、サルコイド症、肺線維症、特発性間質性肺炎および可逆性閉塞性気道疾患(気管支喘息、小児喘息、アレルギー喘息、内因性喘息、外因性喘息、ダスト喘息な

10

20

30

40

50

どの喘息状態、特に慢性喘息、例えば遅発型喘息や気道過敏症を含む）、気管支炎等の治療に有用である。

【0032】本発明の免疫抑制剤はまた、虚血に伴う肝外傷の治療にも有用であろう。

【0033】さらに、本発明の免疫抑制剤は、結膜炎、角結膜炎、角膜炎、春季カタル、ベーチェット病に伴うブドウ膜炎、ヘルペス性角膜炎、円錐角膜、角膜上皮ジストロフィー、角膜白斑、眼天疱瘡、モーレン潰瘍、強膜炎、バセドウ病による眼筋麻痺、重篤な眼内炎などの眼病の治療にも有用であり得る。

【0034】本発明の免疫抑制剤はまた、粘膜または血管の炎症（例えば、ロイコトリエンB₄ 媒介性疾患、胃潰瘍、虚血性疾患および血栓症に起因する血管損傷、虚血性腸疾患、炎症性腸疾患（例えばクローン病、潰瘍性大腸炎）、壊死性腸炎）または熱傷に伴う腸障害の予防および治療にも有用である。

【0035】さらに、本発明の免疫抑制剤は、腎疾患（例えば間質性腎炎、グッドパスチャー症候群、溶血性尿毒症症候群および糖尿病性腎症など）、神経疾患（多発性筋炎、ギラン・バレー症候群、メニエール病および神経根症など）、内分泌性疾患（甲状腺機能亢進症およびバセドウ病など）、血液疾患（赤芽球ろう、再生不良性貧血、低形成貧血、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、顆粒球減少症、赤血球形成欠如など）、骨疾患（骨粗鬆症など）、呼吸疾患（サルコイド症、肺線維症、特発性間質性肺炎など）、皮膚病（皮膚筋炎、尋常性白斑、尋常性魚鱗癬、光アレルギー性過敏症、皮膚T細胞リンパ腫など）、循環器疾患（動脈硬化症、大動脈炎、結節性多発動脈炎、心筋炎など）、コラーゲン病（強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、シェーグレン症候群など）、アジボース、好酸球性筋膜炎、歯周病、ネフローゼ症候群、溶血性尿毒症症候群および筋ジストロフィーの予防および治療にも有用である。

【0036】また、本発明の免疫抑制剤は、腸炎またはアレルギー症（セリアック病、直腸炎、好酸球性胃腸炎、紅皮症、クローン病、潰瘍性大腸炎）、並びに胃腸管から離れたところで症候性の病徴（例えば、偏頭痛、鼻炎、湿疹）を示す食物関連アレルギー症の治療にも有用であり得る。

【0037】本発明の免疫抑制剤はまた、肝臓再生作用および/または肝細胞の肥大および過形成を促進する作用を有する。それ故、免疫原性の疾患（例えば自己免疫肝炎、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎のような慢性自己免疫肝臓病など）、部分的な肝臓切除、急性肝臓壊死（例えば毒素、ウイルス肝炎、ショックまたは酸欠に起因する壊死）、B型肝炎、C型肝炎、並びに肝硬変などの肝臓病の予防および治療に有用である。

【0038】本発明の免疫抑制剤はまた、抗菌剤としても利用できるので、病原微生物等に起因する疾患の治療に有用であり得る。

【0039】さらに、本発明の免疫抑制剤は悪性関節リウマチ、アミロイド症、劇症肝炎、シャイ・ドレーガー症候群、膿疱性乾癬、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、内分泌性眼筋麻痺、進行性全身性硬化症、混合結合組織病、大動脈炎症候群、ウェゲナー肉芽腫症、活動性慢性肝炎、エヴァンス症候群、花粉症、特発性上皮小体機能低下症、アジソン病（自己免疫副腎炎）、自己免疫睾丸炎、自己免疫卵巣炎、寒冷赤血球凝集素、発作性寒冷赤血球凝集素、悪性貧血、成人T細胞白血病、自己免疫萎縮性胃炎、類狼瘡肝炎、尿管間質性腎炎、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、リウマチ熱、心筋梗塞後症候群および交感性眼炎の予防および治療にも有用であり得る。

【0040】本発明の組成物は抗真菌作用を有するので抗真菌剤としても有用である。

【0041】本発明の免疫抑制剤に使用することができる医薬上許容され得る担体は当業者によく知られている。担体の選択は、幾分は特定の化合物によって、また幾分は該免疫抑制剤を投与するのに使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の免疫抑制剤には、非常に多様な好適な処方がある。

【0042】経口投与に好適な製剤には（a）水あるいは生理食塩水のような希釈液に有効量の化合物を溶解させたような液状溶液剤、（b）各々、特定量の活性成分を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤あるいは錠剤、（c）適当な液体での懸濁液剤および（d）好適な乳剤が含まれる。錠剤にはラクトース、マニトール、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、微晶性セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、コロイド性二酸化シリコン、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸およびその他の賦形剤、着色剤、希釈液、緩衝剤、給湿剤、保存剤、芳香剤および医薬上適合し得る担体を一つあるいはそれ以上含めることができる。ロゼンジ剤は、活性成分を通常シュクロースやアラビアゴムあるいはトラガカントといった香味料に含めることができ、また、香錠剤は、ゼラチンやグリセリン、あるいはシュクロースやアラビアゴム乳剤、ゲル剤などのような不活性な基剤に活性成分を含み、活性成分に加え、この分野で公知の担体が含まれる。

【0043】吸入による投与に好適な製剤には、ジクロロジフロロメタン、プロパン、窒素等のような加圧された許容しうる噴射剤内に入れられるエアロゾル製剤が含まれる。活性薬は好適な賦形剤とともにエアロゾル化してもよい。

【0044】静脈内あるいは腹腔内投与に投与に好適な製剤としては、例えば水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤および予定された被投与者の血液と製剤を等張にするための溶質が含まれていても良く、また、水性および非水性

の無菌の懸濁液剤があり、これには懸濁剤、可溶化剤、肥厚剤、安定化剤および保存剤が含まれていてもよい。製剤はアンプルやバイアルのように単位投与量あるいは多投与量で容器に封入され、フリーズドライ（凍結乾燥）され、注射するためには使用直前に例えば水のような注射用の無菌の液体の担体を添加するだけでよい状態で保存され得る。前述の種類の無菌の粉末、顆粒および錠剤の即席の注射液剤や懸濁液剤が調製され得る。

【0045】製剤中に使用されるALH免疫抑制化合物の量は疾患の種類、重篤度、体重、性別、年齢等によって変化するが、例えば、腎臓移植における拒絶反応を抑制する場合、成人1日あたり0.01～1.0mg（力価）を1回または複数回に分けて投与すればよい。

【0046】これらの製剤は、1以上の他の免疫抑制化合物、例えばステロイド類（プレドニゾン、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン等）または非ステロイド抗炎症剤を含んでいてもよい。好ましくは、アザチオプリン、ブレキナールナトリウム、デオキシスベルグアリン、ミゾリピン、ミコフェノール酸2-モルホリノエチル、シクロスポリン、ラパマイシン、タクロリムス水和物、レフルノマイドおよびOKT-3などとの組み合わせである。ALH免疫抑制活性の作用機作は、従来広く用いられている多くの免疫抑制化合物と同様の副作用を生じないので、これらの化合物は新規な相乗作用を示し、また治療に要する個々の化合物の量を減少させることができる。

【0047】本発明はまた、試料中のALH免疫抑制活性の有無を同定する方法を提供する。この方法は、組織または細胞を移植された哺乳動物に同定すべき試料を投与し、該哺乳動物中の移植組織または細胞の生存を調べることをにより免疫抑制活性を評価するとともに、末梢もしくは腸間膜リンパ組織またはバイエル板中のリンパ球に対する血液中の循環リンパ球の割合を測定することによりリンパ球ホーミング促進活性を測定する工程を含む。ALH免疫抑制活性を同定することができる。哺乳動物として、好ましくはラットやマウスのような齧歯類が使用でき、移植組織または細胞としては、好ましくは心臓、腎臓または皮膚組織などが使用される。

【0048】また、組織または細胞移植された動物を用いない方法として、予め標識されたリンパ球を哺乳動物に導入して、同定すべき試料を投与後に種々の組織および血液中の該標識リンパ球の分布パターンを検出する方法がある。試料がALH免疫抑制活性を含有していれば特徴的なリンパ球の分布パターンを示す。例えば、典型的な結果が図13に示される。標識物質としてはカルセイン等が好ましく例示されるが元々レシビエント中に存在したリンパ球とから区別されて検出され得るものであれば特に制限はない。図13の例において、雌性レシビエントに導入された雄性リンパ球の使用は予め標識されたリンパ球の使用に相当する。雄性の予め標識されたリ

ンパ球はレシビエントのリンパ球とは検出可能に相違する。この場合の標識は遺伝子配列ラベルである。したがって、本発明で使用される予め標識されたリンパ球は特殊な化学的標識物質やリンパ球に結合、会合もしくは接着した他のラベルに限定されない。

【0049】本発明はまた、リンパ球の輸送を制御するのに有効な量の上記免疫抑制剤を、哺乳動物に投与することを含む哺乳動物のリンパ球輸送制御方法を提供する。このような方法はリンパ球の再循環における指向性のメカニズムやホーミング受容体の解明などの研究において有用な実験動物モデルを提供し得る。

【0050】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。本実施例では、特にFTY720およびCsAおよびTRLとそれとを組み合わせたALH免疫抑制組成物について述べるが、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0051】実施例1 主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)非適合ラット間の同種皮膚移植片の生着率に及ぼすFTY720の効果

千葉ら[Transplant. Proc., 28: 1056 (1996)]に記載される方法に準じて、ドナーおよびレシビエントとしてMHC非適合性ラット系統を用いて同種皮膚移植片の生着アッセイを行った。MHC非適合性ラット系統としてWKAHドナー(RT1^k)およびF344レシビエント(RT1^{lv})を選択した。全層植皮片(2.4×2.4cm)をレシビエントの側胸郭に移植し、滅菌した殺菌ガーゼで包帯した。ついで胸部を伸縮性の包帯で覆った。移植5日後、包帯を取り除いて毎日拒絶を検査した。拒絶は移植片上皮の9.0%以上の壊死と定義した。対照(媒体のみの処理)群は移植6～7日後にすべての移植片が拒絶反応を示した。FTY720を0.1mg/kg体重以上の投与量で経口投与することにより、ドーズ依存的に移植片の生着が顕著に延長された(図1)。FTY720を10mg/kg体重、14日間投与した結果、移植片の生着は腎臓の毒性や他の毒性の兆候なしに生着日数の中央値(MST)27.0日にまで延長した。図1に示されるように、CsAおよびTRLもこのモデルにおいてはそれぞれ3mg/kg体重以上および0.3mg/kg体重以上の経口投与で有効であった。CsA10.0mg/kg体重またはTRL1.0mg/kg体重を14日間繰り返し投与した結果、MSTはそれぞれ26.0日および22.5日に延長した。しかしながら、CsA10.0mg/kg体重を投与したレシビエント8検体中1検体が投与期間中に死亡した。これらの結果から、FTY720はMHCバリアーを越えて皮膚同種移植片の生着を延長させ、CsAおよびTRLよりも高い効力を有することが判明した。

【0052】臨床臓器移植において、CsAとプレドニゾンまたは他の免疫抑制剤との併用治療が個々の薬剤

の副作用を軽減するために広く用いられている(13-14)

。CsAと組み合わせたFTY720の使用が優れた相乗効果を生じることを実証するために、実験的同種移植モデルを用いた。MHC非適合性ラット同種皮膚移植モデルにおいて、CsA3または10mg/kg体重とともにFTY720を投与して実験を行った。FTY720をCsA3または10mg/kg体重と組み合わせで投与した場合(図2)、FTY720またはCsAを単独で用いた場合の治療効果(図1)と比較して同種皮膚移植片の生着が延長した。CsA10mg/kg体重と併用した場合、0.1mg/kg体重のFTY720でさえ、8レシビエントラット中5検体においてMST70日以上という顕著な同種移植片生着延長効果を示した(図2)。Kahanら[Transplantation, 55: 894 (1993)]の方法により計算される併用指数値(combination index)はCsAとFTY720の併用投与で0.1未満であり、相乗効果を示した。これらの併用治療実験の結果から、FTY720はCsAと相乗的に作用することが示された。同様の相乗効果は、このモデルにおけるFTY720とTRLとの併用治療でも得られた(図2)。LEWドナーおよびF344レシビエントのMHC適合性ラット系統[Transplant. Proc., 28: 1056 (1996)]においても、0.03mg/kg体重以上のFTY720が顕著な同種皮膚移植片の生着延長効果を示し、3mg/kg体重のCsAとの併用投与により同種移植片の生着延長に相乗効果が認められた。

【0053】実施例2 MHC非適合ラット間の異所性同種心移植片の生着率に及ぼすFTY720の効果
異所性同種心移植片の生着率に及ぼすFTY720の効果をWKAH心組織ドナー(RT1^k)およびACIレシビエント(RT1^{ev1})ラットを用いてCsAおよびTRLの効果と比較した。手順の詳細は文献[Transplant. Proc., 28:1060 (1996)]にしたがった。ドナーの心臓はMillerらの技術によりレシビエントの頸部に移植した。ドナーの心臓の肺動脈をレシビエントの右外頸静脈に端部と側部を繋ぐように吻合した。ドナーの腕頭動脈をレシビエントの左総頸動脈に端部と端部を繋ぐように吻合した。移植日を0日として心停止を移植片生着の最終日と定義した。100日を越える移植心臓の生着を半永久的または長期生着と見なした。その結果を図3に示す。対照(媒体のみの処理)群ではすべての同種心移植片が移植後14日以内(MST:12.0日)に拒絶された。経口投与量0.1mg/kg体重以上のFTY720処理により同種心移植片の生着が顕著に延長された。FTY720を0.1, 0.3, 1, 3および10mg/kg体重14日間投与した場合のMSTはそれぞれ20.0, 21.0, 25.5, 29.5および58.5日であった(図3)。10mg/kg体重のFTY720投与により8レシビエントラット中3匹で100日を越える移植片の長期(半永久的)生着が認められ

た。CsA(投与量10mg/kg体重以上)およびTRL(投与量1mg/kg体重以上)もまた対照群に比して有意に同種心移植片の生着を延長させた。しかしながら、これらの薬剤は試験した最高の投与量においても移植片の長期生着をほとんど誘導しなかった(図3)。これらの結果より、FTY720はラット同種心移植においてCsAやTRLよりも効力が高く、該化合物が血管新生した臓器移植において半永久的な免疫寛容状態を誘導する能力を有することが示された。

【0054】この同種心移植モデル(WKAHドナーおよびACIレシビエント)におけるCsAと組み合わせたFTY720の効果を調べた。経口投与量0.1mg/kg体重以上のFTY720は、CsA3mg/kg体重との併用において、FTY720またはCsA単独で処理した場合に比べて顕著な同種移植片の生着延長効果を示した(図4)。CsAと同時に投与すると、FTY720はレシビエントの50%以上において移植片の長期生着を生じさせた。1mg/kg体重のTRLと組み合わせた経口投与量1mg/kg体重のFTY720もまた、このモデルにおける移植片の生着に相乗効果を示した(図4)。これらの結果から、FTY720をCsAまたはTRLとともに投与すると移植片の生着が相乗的に延長され、FTY720単独の場合よりも高い頻度で半永久的な免疫寛容状態を誘導することが示された。

【0055】実施例3 イヌ同種腎移植片の生着率に及ぼすFTY720とCsAとの併用効果

イヌ同種腎移植モデルにおいて、アザチオプリンまたはミゾリビンのいずれかをCsAと併用することによりいずれかの薬剤を単独で用いた場合に比べて移植片の生着が顕著に延長したことが報告されている[Bur. Surg. Res., 21: 65 (1989); Transplantation, 46: 768 (1988)]。そこで、イヌ同種腎移植片の生着に及ぼすFTY720とCsAとの併用効果を雑種犬ドナーおよびビーグル犬レシビエント[Transplant. Proc., 28: 1062 (1996); Transplantation, 61: 200 (1996); Transplant. Proc., 28: 1375 (1996)]を用いて調べた。雑種犬ドナーの腎臓を右腸骨窩にてビーグル犬に移植し、次いでレシビエントから両方の腎臓を摘出した。血清クレアチンおよび血中尿素窒素レベルを測定して生着をモニターした。移植拒絶は血清クレアチンレベルが10.0mg/dLを越えるまで増加するか、あるいは血中尿素窒素レベルが200mg/dLを越えるまで上昇した日と定義した。図5に示すように、対照(媒体のみの処理)群では血清クレアチンレベルは10日以内に不可逆的に上昇し、すべての動物が17日以内に急性拒絶による腎不全のために死亡した。血清クレアチンレベルは5mg/kg体重のFTY720または10mg/kg体重のCsA処理を行った群においても14日以内に上昇した。FTY720とCsAを併用すると、5レシビエント中4

匹で血清クレアチンレベルは移植後少なくとも30日間完全に正常レベルを維持した(図5)。生着率曲線を図6に示す。対照群のMSTは9.0日であった。5mg/kg体重のFTY720または10mg/kg体重のCsAで処理した結果、移植片の生着はわずかに延長したが有意ではなかった(MSTはFTY720処理群が12.0日、CsA処理群が11.0日であった)。しかしながら、5mg/kg体重のFTY720および10mg/kg体重のCsAを併用して処理した結果、MSTは74.0日と顕著に移植片の生着日数が延長した。10mg/kg体重のCsAと組み合わせると、より少量のFTY720(0.1~3mg/kg体重)でも同種腎移植片の生着が顕著に延長され(図7)、しかも腎機能および肝機能に重篤な毒性の徴候は見られなかった。CsAとFTY720の併用処理によりクレアチンの血中濃度は変化しなかった。これらの結果からFTY720がCsAと相乗的に作用することが示唆された。

【0056】実施例4 ラットにおける移植片対宿主反応(GvHR)に及ぼすFTY720の効果

LEWラット由来脾細胞(2.5×10^6 個)を(LEW×BN)F₁(RT1^l)ラットの足底に皮下注射して膝窩リンパ節の重量の増大を誘導した[Transplant. Proc., 28: 1064 (1996)]。重量は7日後に最大となった。FTY720およびCsAをそれぞれ0.1mg/kg体重以上および3mg/kg体重以上の量で経口投与すると用量依存的に膝窩リンパ節の肥大が顕著に阻害された(図8)。したがって、ラットの局所的GvHRにおけるFTY720の免疫抑制活性はCsAのそれより30倍強力ことがわかった。致死的なGvHRの防止におけるFTY720の効果を調べるために、LEWドナーラット由来の脾臓リンパ球(1×10^6 個)をシクロホスファミドで前処理した(LEW×BN)F₁レシビエントに静脈内注射した。シクロホスファミド(塩野義製薬)は200mg/kg体重の量で与えた。その結果を図9に示す。対照(媒体のみの処理)群では、脾細胞の注射後15日以内にすべてのラットで紅皮や脱毛などの重篤なGvHRの症状が進行し、MSTは22.0日で死亡した。10mg/kg体重のCsAで30日間処理すると、レシビエントラットの生存は顕著に延長した。しかしながら、CsA投与を停止すると重篤なGvHRの症状を引き起こし、その結果すべてのレシビエントが42日以内に死亡した(MST: 40日)。0.1mg/kg体重のFTY720を30日間投与すると、GvHRに付随する症状の進行は妨げられ、宿主の生存が顕著に延長された(MST: 50.0日)。0.3mg/kg体重のFTY720で処理すると、5ラット中4匹がGvHRに付随する症状を示すことなく60日を越えて生存した。FTY720は致死性GvHRモデルにおいて少ない投与量(0.1~3mg/kg体重)での処理により長期間続く不応答を誘導し、GvHRを完

全に防止した。

【0057】実施例5 同種抗原で刺激されたラット脾臓T細胞におけるIL-2 mRNAの発現に及ぼすFTY720の効果

CsAおよびTRLは抗原またはマイトジェンで刺激されたヘルパーT細胞におけるIL-2の産生およびIL-2 mRNAの発現を阻害することが報告されている[J. Antibiotics, 40: 1256 (1987); Cell, 66: 807 (1988)]。そこで、F344ラットの脾臓T細胞を反応細胞、WKAHラットの脾細胞をマイトマイシンCで前処理したものを刺激細胞として用いた同種リンパ球混合培養において、同種抗原により誘導されるIL-2 mRNAの発現に及ぼすFTY720の効果をCsAおよびTRLのそれと比較する実験を行った[Transplant. Proc., 28: 1056 (1996)]。各化合物、FTY720、CsAおよびTRLを、所望の濃度となるように培養(10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地中のF344ラット脾細胞(5×10^6 個/mL))に加えた。以下に詳述するように、ハウスキーピング遺伝子であるHPRTを内部標準として用いて、同じHPRT mRNAレベルに対するIL-2 mRNAレベルに換算して比較した。

【0058】同種リンパ球混合培養を、ナイロン非付着性のF344ラット(RT1^l)脾細胞を反応細胞、WKAHラット(RT1^k)の脾細胞を4.0μg/mLマイトマイシンCで30分間前処理したものを刺激細胞として用いて行った。種々の濃度のFTY720、CsAおよびTRLの存在下で、反応細胞(5×10^5 個/ウェル)を同数の刺激細胞とともに10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地2mL中、37℃、5%CO₂雰囲気下で培養した。48時間培養後、細胞を遠心分離により回収した。細胞中のIL-2 mRNAの発現はPCR法により測定した。

【0059】全RNAを10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、5mM MgCl₂、1mM dNTPs (dATP、dTTP、dCTPおよびdGTP)、60U RNase阻害剤(宝酒造)、15U トリ骨髄球症ウイルス由来の逆転写酵素(宝酒造)および150pmol ランダムノナーを含む緩衝液中で30℃、10分および42℃、30分インキュベートして逆転写反応を行った。IL-2およびHPRT mRNA (cDNA) 増幅用プライマーとしてSieglingら[J. Immunol. Methods, 177: 23 (1994)] 記載の配列を使用した。IL-2およびHPRTのPCR産物の長さはそれぞれ351bpおよび608bpである。100ngの全RNAから合成されたcDNAを10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、2mM MgCl₂、200mM dNTPs (dATP、dTTP、dCTPおよびdGTP)、200nMの適切なプライマーペアおよび0.

625U Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造)を含む反応緩衝液25mL中でDNAサーマルサイクラー(Gene Amp PCR system 9600; パーキン・エルマー・シータス)を用いて増幅させた。最初の変性工程の後、IL-2については30サイクル、HPRTについては24サイクルそれぞれ増幅反応を行った。各サイクルは変性: 94℃、15秒、アニーリング: 72℃(IL-2)または65℃(HPRT)、15秒および伸長: 72℃、1.5秒からなる。PCR産物10μLを2%アガロース電気泳動し、増幅DNA断片をSYBR Green I(モレキュラー・プローブズ)で染色した。特異的バンドの蛍光強度を蛍光画像解析装置(Fluor Imager 575; モレキュラー・ダイナミックス)により測定した。

【0060】1.0 nM以上のCsAおよび1 nM以上のTRLは非刺激のコントロールに近いレベルまでIL-2 mRNAの発現を阻害した。一方、FTY 720は1000 nMの濃度でもIL-2 mRNAの発現を阻害しなかった(図10)。同じ濃度範囲でFTY 720は同種抗原またはコンカナバリンAで刺激されたリンパ球によるIL-2産生を阻害しなかった[Transplant. Proc., 28: 1056 (1996)]。これらの結果から、FTY 720はヘルパーT細胞からのIL-2産生を阻害するのとは異なるメカニズムで同種抗原に対する免疫応答を抑制することが明らかとなった。FTY 720がCsAまたはTRLとの組み合わせで同種移植片の生着に相乗効果を示すのは、それがCsAやTRLとは異なる作用機作を有するためである。

【0061】ALH免疫抑制組成物の効果または試料中のALH免疫抑制活性の存在を検出するには他にも数多くの方法がある。例えば、PCRまたはRT-PCRを用いてmRNAレベルを検出し、IL-2のようなサイトカインの発現を測定することは直接的で強力な方法である[Immunol. Rev., 119: 163 (1991); J. Exp. Med., 174: 493 (1991)]。

【0062】実施例6 ラットにおけるリンパ球ホーミングに及ぼすFTY 720の効果

FTY 720処理した無傷または同種移植されたラットにおける末梢血および脾臓のリンパ球の内容を、抗ラットCD3モノクローナル抗体およびCD45RAorA/Bモノクローナル抗体を用いて二色フローサイトメトリーによって解析した[Transplant. Proc., 28: 1056 (1996)]。リンパ球をFITC標識した抗CD3(クローン: 1F4; カルタグ ラボラトリーズ)[J. Immunol., 142: 2791 (1989)]およびフィコエリスリン標識した抗CD45RAorA/B(クローン: OX-33; ファーミンジェン)[Eur. J. Immunol., 15: 168 (1985)]モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーター(EPICS-XL; コールター社)を用いて二色フローサイトメトリーによりT細胞およびB細胞の内容を

測定した。

【0063】末梢血におけるCD3陽性T細胞およびCD45RAorA/B陽性B細胞の数は、FTY 720を0.1~10 mg/kg体重の量で経口投与してから6時間以内に劇的に減少した(図11)。FTY 720処理を中止すると2週間以内に末梢血中のリンパ球数は正常レベルまで回復した。図12はFTY 720を1 mg/kg体重経口投与されたラットの種々のリンパ様組織における細胞数を示している。FTY 720は末梢血だけでなく、脾臓および胸管におけるT細胞およびB細胞数の減少をも誘導した。これとは逆に、腸間膜および末梢リンパ節におけるT細胞およびB細胞数はFTY 720の投与によって顕著に増加した。FTY 720は骨髄細胞、胸腺細胞および多形核細胞数には影響しなかった。

【0064】FTY 720による循環リンパ球の減少は腸間膜、末梢リンパ節およびバイエル板へのリンパ球ホーミングが促進されるためである(図13)。本実験では、0.1 mg/kg体重または1 mg/kg体重のFTY 720を雌性F344ラットに投与してから2.5時間後に雄性F344ラット由来のリンパ球を該ラットの静脈内に注入した。注入30分後に末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節、腋窩リンパ節、バイエル板、肝臓、腎臓および肺を摘出した。Y染色体特異的なSRY-1遺伝子をPCRで増幅することにより、組織試料中の雄性リンパ球を検出した。SRY遺伝子増幅用プライマーとしてはMasakiら[Transplant. Proc., 27: 148 (1995)]に記載の配列を用いた。最初の変性工程の後、cDNA混合物を32サイクルの増幅反応に供した。各サイクルは変性: 94℃、1分、アニーリング: 65℃、30秒および伸長72℃、1分からなる。反応はDNAサーマルサイクラー(Gene Amp PCR system 9600; パーキン・エルマー・シータス)を用いて行った。

【0065】PCR産物10μLを2.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、増幅DNA断片をSYBR Green I(モレキュラー・プローブズ)で染色した。特異的バンドの蛍光強度を蛍光画像解析装置(Fluor Imager 575; モレキュラー・ダイナミックス)により可視化して測定した。10⁶個の雌性リンパ球から抽出された、標準雄性DNA由来のSRYコントロール増幅産物から作成した標準曲線を用いて計算された、10⁶個の雌性細胞中の雄性細胞数が図13に記載される各組織について表示される。その結果、FTY 720は免疫学的に成熟したリンパ球をリンパ節およびバイエル板に隔離することによって免疫抑制活性を発現することが明らかとなった。また、FTY 720はリンパ球のHEVへの接着にも影響する。

【0066】実施例7 インビトロでのラット高内皮性細静脈(HEV)細胞へのラットリンパ球の接着

A_x細胞のようなラットまたはマウス細胞を、20%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地100μLの入った96穴平底マイクロタイタープレートに1×10⁴個/ウェルとなるように播種した。該細胞を37℃、5%CO₂/95%大気雰囲気下で48時間培養した。7週齢のF344ラットまたはC57BL/6マウスの腸間膜リンパ節および腋窩リンパ節から調製したリンパ球を、1μmol/Lのカルセイン-A_Mで氷上30分間標識した。カルセイン-A_Mで標識後、リンパ球を氷冷したRPMI 1640培地で3回洗浄した。ついでHE

V単層を含む96穴マイクロタイタープレートに、1~1000nmol/LのFTY720の存在下または非存在下、該リンパ球を10⁴個/ウェルとなるように加*

インビトロでのHEV細胞へのラットリンパ球の接着に及ぼすFTY720の効果

		蛍光強度 (485nm/530nm) 平均±標準偏差 (n=6)
Control		1876.2 ± 31.2
FTY720	1 nmol/L	2059.2 ± 112.6
	10	2107.2 ± 106.5
	100	2252.0 ± 70.8
	1000	2383.2 ± 115.2

【0068】HEV細胞へのリンパ球の接着は、表2に示すようにHEV細胞のみを1~100nmol/LのFTY720で3時間前処理することによって増加した。対照的にラットリンパ球を100nmol/LのFTY720で3時間前処理してもHEV細胞への接着は促進されなかった。これらの結果から、FTY720は※

*えた。カルセイン標識したリンパ球とHEV単層を37℃、5%CO₂/95%大気雰囲気下で120分間培養した。インキュベーション終了後、該プレートの上下をひっくり返し、30分放置してHEV非接着細胞を除去した。HEV単層に接着したカルセイン標識リンパ球を、1%フニデットP-40を含む蒸留水を加えて溶解し、蛍光を蛍光マイクロプレートリーダー (Cyto Fluor 2350) を用いて485/530nmにて測定した。その結果、表1に示すように、FTY720は1nmol/L以上でカルセイン標識したリンパ球のインビトロでのHEVへの接着を亢進させた。

【0067】

【表1】

※周知の免疫抑制剤とは異なり、リンパ球ではなくリンパ節およびバイエル板中のHEV細胞に作用することが示唆された。

【0069】

【表2】

HEV細胞をFTY720で前処理し、リンパ球は処理しなかった場合のリンパ球の接着の増加

FTY720処理		蛍光強度 (485nm/530nm) 平均±標準偏差 (n=6)
リンパ球	HEV	
実験例1		
-	-	1071.7 ± 342.8
-	1 nmol/L	1215.7 ± 191.2
-	10	2926.0 ± 196.4
-	100	2510.2 ± 118.8
実験例2		
100 nmol/L	-	1967.7 ± 7.8
-	-	1945.7 ± 5.2

【0070】実施例8 インビボにおける末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節およびバイエル板中のリンパ球数に及ぼすFTY720の効果

6週齢の雄性F344ラットにFTY720を0.1および1mg/kg体重で経口投与した。投与3、12、24時間後に末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節およびバイエル板を切除し、これらの組織のリンパ球数を周知の方法でフローサイトメーター (EPICS-XL) を用いて測定した。表3に投与24時間後の典型的結果を示す。末梢血および脾臓のリンパ球数はFTY720投与

40 後、投与量依存的に減少した。これとは逆に、腸間膜リンパ節およびバイエル板のリンパ球数はインビボでのFTY720の投与後顕著に増加した。これらの結果から、FTY720による末梢血および脾臓のリンパ球数の減少は、腸間膜リンパ節、末梢リンパ節またはバイエル板へのリンパ球ホーミングまたはリンパ球移行が促進されるためであることが示された。

【0071】

【表3】

インビゴでの末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板におけるリンパ球数に及ぼすFTY720の効果

リンパ球数 平均±標準偏差 (細胞/μL)		
末梢血	Control (Vehicle)	5564.5 ± 422.4
	FTY720 0.1 mg/kg p.o.	1071.9 ± 59.3 **
	FTY720 1 mg/kg p.o.	667.2 ± 199.8 **
平均±標準偏差 (×10 ⁶ 細胞/組織)		
脾臓	Control (Vehicle)	821.3 ± 85.4
	FTY720 0.1 mg/kg p.o.	652.3 ± 31.2
	FTY720 1 mg/kg p.o.	538.0 ± 74.1 *
平均±標準偏差 (×10 ⁶ 細胞/組織)		
腸間膜リンパ節	Control (Vehicle)	245.3 ± 10.0
	FTY720 0.1 mg/kg p.o.	421.8 ± 27.4 **
	FTY720 1 mg/kg p.o.	434.3 ± 33.2 **
平均±標準偏差 (×10 ⁶ 細胞/組織)		
パイエル板	Control (Vehicle)	233.0 ± 38.3
	FTY720 0.1 mg/kg p.o.	551.5 ± 103.5 **
	FTY720 1 mg/kg p.o.	628.8 ± 61.1 **

* : p<0.05, ** : p<0.01, Dunnett's テスト (n=4)

【0072】実施例9 種々のリンパ系組織におけるカルセイン標識リンパ球のリンパ球ホーミングに及ぼすFTY720の効果

6週齢のF344ラットの腸間膜リンパ節および腋窩リンパ節から調製されたリンパ球を、1 μmol/Lのカルセイン-AM (モレキュラープローブズ) で氷上30分間インキュベートして標識した。カルセイン-AM標識後、リンパ球を氷冷した生理食塩水で3回洗浄した。その後、5×10⁷個のカルセイン標識リンパ球を性別および年齢が一致するF344ラットに尾静脈注射した。リンパ球注射後、5時間前に予め該ラットに0.1または1 mg/kg体重のFTY720を経口投与しておいた。注射の30分後、腸間膜リンパ節、腋窩リンパ節、パイエル板および脾臓を摘出し、カルセイン標識されたリンパ球数をフローサイトメーター (EPICS-XL) を用いて測定した。リンパ球ホーミング受容体に対する抗体の影響を調べるために、カルセイン標識リンパ球を60 μg/mlのマウス抗ラットCD49dモノクローナル抗体 (クローン: TA-2) [Eur. J. Immunol., 23: 2181 (1993)]、ハムスター抗ラットCD62

Lモノクローナル抗体 (クローン: HRL3) [J. Immunol., 147: 4178 (1991)] またはマウス抗ラットCD11aモノクローナル抗体 (クローン: WT. 1) [Eur. J. Immunol., 21: 627 (1991)] (以上、生化学工業) のいずれか、あるいはそれらの組み合わせで4℃、30分間処理した。対照として非特異免疫グロブリン (ファーマミンジェン) で同様に処理したものを用いた。その結果を表4~7に示す。1 mg/kg体重のFTY720の経口投与によりカルセイン標識されたリンパ球の腸間膜リンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングが誘導された。抗CD62L (L-セレクチン)、抗CD49d (α₄-インテグリン) または抗CD11a (αL-インテグリン) 抗体はFTY720によるリンパ球ホーミングを顕著に阻害した。さらに、FTY720により誘導されるリンパ球ホーミングは抗CD62L、抗CD49dおよび抗CD11a抗体で同時に処理することによりほぼ完全に阻害された。

【0073】

【表4】

FTY720により誘導されるリンパ球ホーミングに及ぼす
抗CD62L抗体の効果

リンパ球ホーミング (カルセイン標識リンパ球数) 平均±標準偏差 (n=4)	
腸間膜リンパ節	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	69536 ± 12299
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体	20577 ± 719 *
パイエル板	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	25929 ± 3575
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体	3922 ± 672 ***

* : p<0.05, ** : p<0.01, (Student's テスト)

【0074】

* * 【表5】

FTY720により誘導されるリンパ球ホーミングに及ぼす
抗CD49d抗体の効果

リンパ球ホーミング (カルセイン標識リンパ球数) 平均±標準偏差 (n=4)	
腸間膜リンパ節	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	88350 ± 13029
FTY720 1 mg/kg + 抗CD49d抗体	34588 ± 3701 *
パイエル板	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	26562 ± 4474
FTY720 1 mg/kg + 抗CD49d抗体	5894 ± 471 *

* : p<0.05, (Student's テスト)

【0075】

※ ※ 【表6】

FTY720により誘導されるリンパ球ホーミングに及ぼす
抗CD11a抗体の効果

リンパ球ホーミング (カルセイン標識リンパ球数) 平均±標準偏差 (n=4)	
腸間膜リンパ節	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	86021 ± 12961
FTY720 1 mg/kg + 抗CD11a抗体	47116 ± 3608 *
パイエル板	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	15534 ± 5371
FTY720 1 mg/kg + 抗CD11a抗体	5894 ± 1707 *

* : p<0.05, (Student's テスト)

【0076】

【表7】

FTY720により誘導されるリンパ球ホーミングに及ぼす
複数の抗リンパ球抗体の効果

リンパ球ホーミング 平均±標準偏差 (n=4)	
腸間膜リンパ節	(カルセイン標識リンパ球数)
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	62644 ± 3175
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体 + 抗CD49d抗体 + 抗CD11a抗体	2019 ± 236 **
パイエル板	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	32822 ± 4191
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体 + 抗CD49d抗体 + 抗CD11a抗体	2181 ± 181 **
腸間膜リンパ節	(カルセイン標識リンパ球数/10000細胞)
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	167.7 ± 12.5
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体 + 抗CD49d抗体	15.5 ± 4.6 **
パイエル板	
FTY720 1 mg/kg + Control IgG	115.3 ± 1.0
FTY720 1 mg/kg + 抗CD62L抗体 + 抗CD49d抗体	58.6 ± 4.7 **

* : p<0.05. ** : p<0.01. (Student's tテスト)

【0077】これらの結果から、FTY720は末梢循環リンパ球のリンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進すること、並びにこのリンパ球ホーミング促進作用は、CD62L、CD49d/β-7、CD11a/CD18 (LFA-1)などのリンパ球ホーミング受容体と、HEV細胞表面上に発現するそれらのリガンド (GlyCAM-1、MAdCAM-1、ICAM-1など)との接着に関連することが示された。

【0078】

【発明の効果】本発明のALH免疫抑制化合物を有効成分とする免疫抑制剤は、従来の免疫抑制剤とは異なる作用機作を有し且つ毒性の副作用が小さいので、単独投与の他、例えば、CsAやTRLなどの他の免疫抑制剤と併用することにより、副作用を生じることなく高い免疫抑制効果を示す。したがって、移植の拒絶反応、自己免疫疾患などの予防および治療にきわめて有用である。また、本発明のALH免疫抑制活性の同定方法は、新規なALH免疫抑制化合物のスクリーニングに有用である。さらに、本発明のリンパ球輸送制御方法によれば、リンパ球の再循環メカニズムやホーミング受容体の解明などの分子レベルでの研究において有用な研究手段となり得る実験動物モデルを作製することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】MHC非適合ラット間の同種皮膚移植片の生着率に及ぼすFTY720、CsAおよびTRLの効果を示す図である。[* : p<0.05, 媒体投与群を対照とした一般化ウィルコクソン検定およびボンネルの多重比較, n : 動物の匹数]

【図2】MHC非適合ラット間の同種皮膚移植片の生着

率に及ぼすFTY720とCsAあるいはTRLとの併用効果を示す図である。[* : p<0.05, CsAあるいはTRL単独投与群を対照とした、一般化ウィルコクソン検定およびボンネルの多重比較, n : 動物の匹数]

【図3】MHC非適合ラット間の異所性の同種心移植片の生着率に及ぼすFTY720、CsAおよびTRLの効果を示す図である。[* : p<0.05, 媒体投与群を対照とした一般化ウィルコクソン検定およびボンネルの多重比較, n : 動物の匹数]

【図4】MHC非適合ラット間の異所性の同種心移植片の生着率に及ぼすFTY720とCsAあるいはTRLとの併用効果を示す図である。[* : p<0.05, CsAあるいはTRL単独投与群を対照とした、一般化ウィルコクソン検定およびボンネルの多重比較, n : 動物の匹数]

【図5】雑種犬の同種腎移植片を移植したビーグル犬レシビエントにおける血清クレアチンレベルに及ぼすFTY720、CsAの単独投与およびそれらの併用の効果を示す図である。各曲線は個々の動物における結果を示す。(n : 動物匹数)

【図6】イヌ (雑種ドナー : ビーグル犬レシビエント)における同種腎移植片の生着率に及ぼすFTY720、CsAの単独投与およびそれらの併用の効果を示す図である。[* : p<0.05, 媒体投与群を対照とした一般化ウィルコクソン検定およびボンネルの多重比較, n : 動物の匹数]

【図7】イヌ (雑種ドナー : ビーグル犬レシビエント)における同種腎移植片の生着率に及ぼすFTY720と

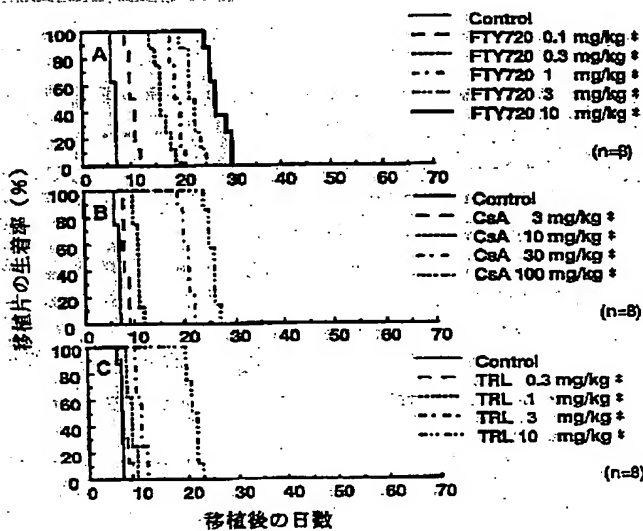
CsAとの併用効果を示す図である。[*: $p < 0.05$, CsA単独投与群を対照とした一般化ウィルコクソン検定およびボンフェローニの多重比較, n:動物の匹数]

【図8】ラットにおけるGvHRに起因する膝窩リンパ節肥大に及ぼすFTY720およびCsAの経口投与による効果を示す図である。[*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 媒体投与群を対照としたダネット法, n:動物の匹数]

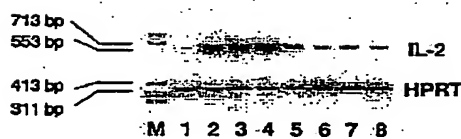
【図9】致死性GvHRラットに及ぼすFTY720およびCsAの効果を示す図である。[*: $p < 0.05$, 媒体投与群を対照とした一般化ウィルコクソン検定およびボンフェローニの多重比較, n:動物の匹数]

【図10】同種抗原刺激されたラット脾臓T細胞におけるIL-2 mRNAレベルに及ぼすFTY720, CsAおよびTRLの効果を示す図である。[レーンM: 分子量マーカー; レーン1: 非刺激T細胞; レーン2: 同種抗原刺激T細胞; レーン3: 1.0×10^{-6} M FTY720処理; レーン4: 1.0×10^{-5} M FTY720処理; レーン5: 1.0×10^{-6} M CsA処理; レーン6: 1.0×10^{-5} M CsA処理; レーン7: 0.1×10^{-6} M TRL処理; レーン8: 1.0×10^{-6} M TRL処理; 内部標準としてハ

【図1】



【図10】



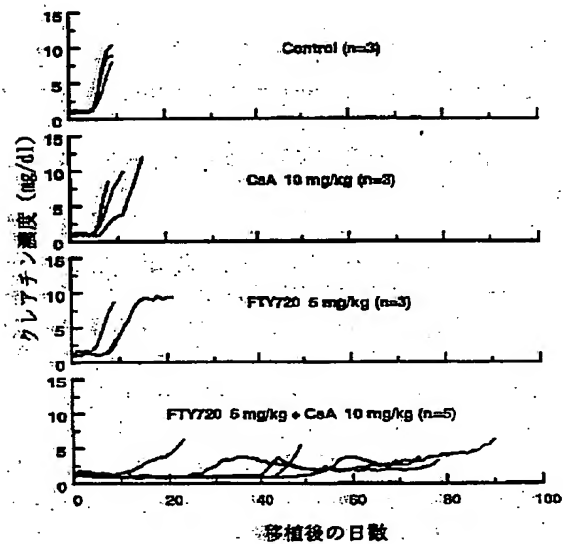
ウスキーピング遺伝子であるヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T) を用いた]

【図11】FTY720を投与されたLEWラット末梢血中の白血球細胞の構成を示す図である。末梢血はFTY720投与から6時間後に採取した。結果は6匹の動物からのサンプルの平均値で示している。

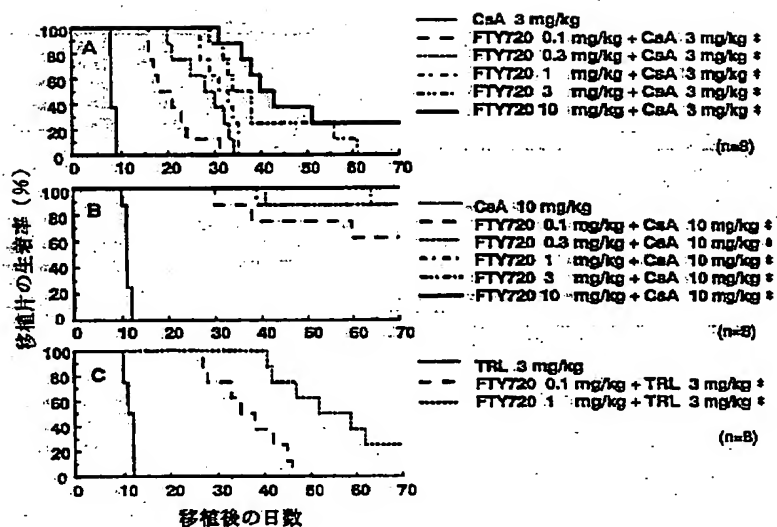
【図12】ラットの種々のリンパ系組織におけるリンパ球の分布に及ぼすFTY720の効果を示す図である。[結果は1 mg/kgのFTY720を投与してから6時間後の数値を非投与群(-)に対する百分率(4~6サンプルの平均値)で示している。]

【図13】ラットの種々のリンパ系組織へのリンパ球移行に及ぼすFTY720の効果を示す図である。雄性F344ラットリンパ球を雌性F344ラットレシビエントに静脈内注射してから30分後のレシビエントリンパ系組織中の雄性F344ラットリンパ球数を、レシビエントの細胞に対する百分率で示している。細胞はFTY720の投与から2.5時間後に注射された。[*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 媒体投与群を対照としたダネット法]

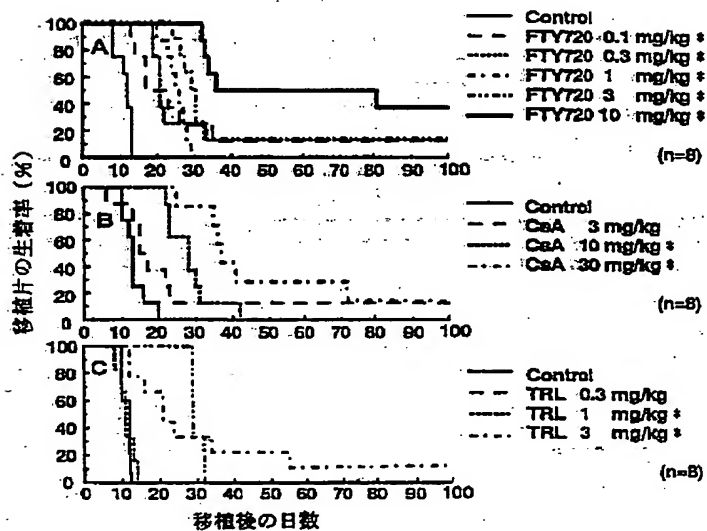
【図5】



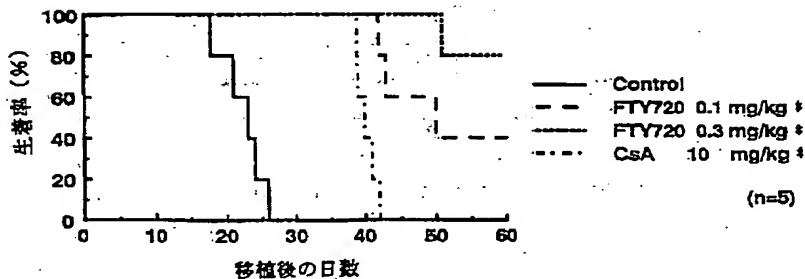
【図 2】



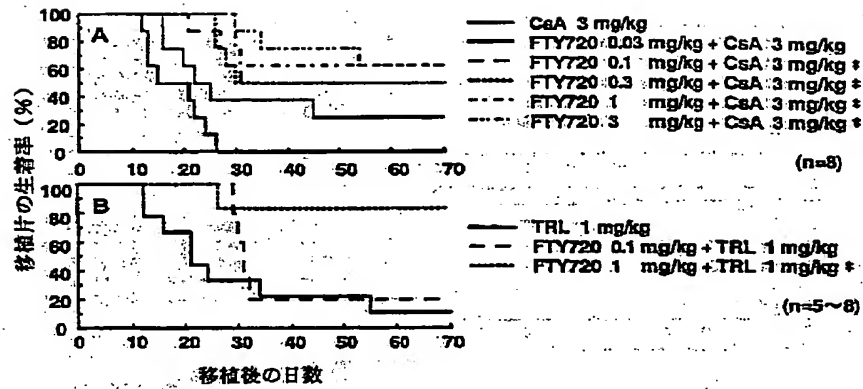
【図 3】



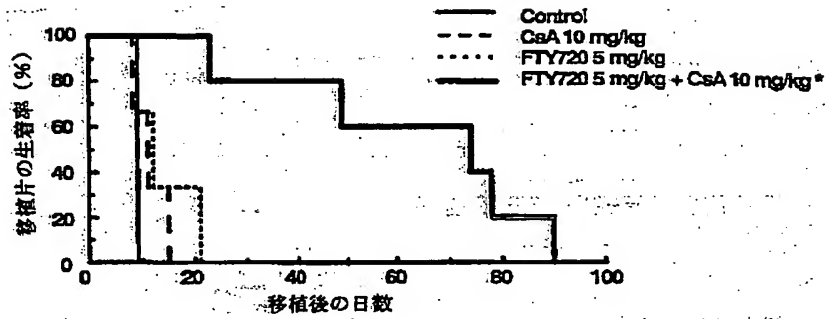
【図 9】



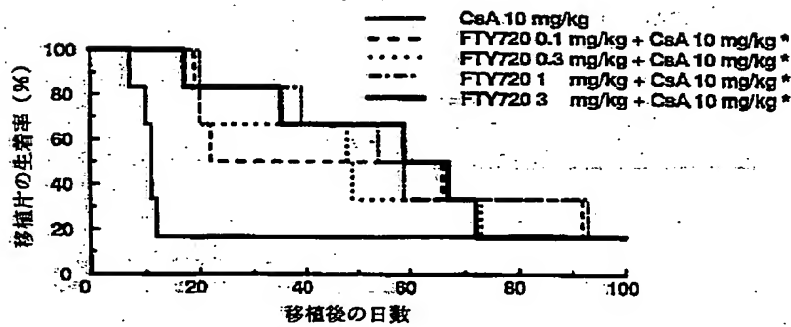
【図4】



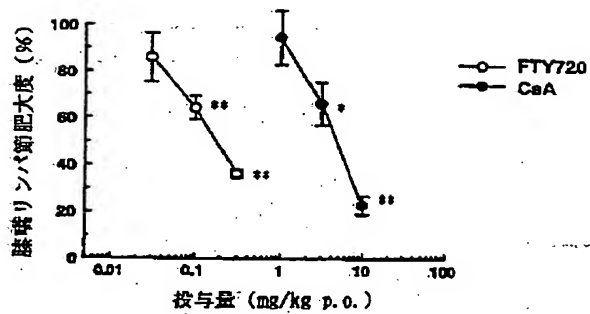
【図6】



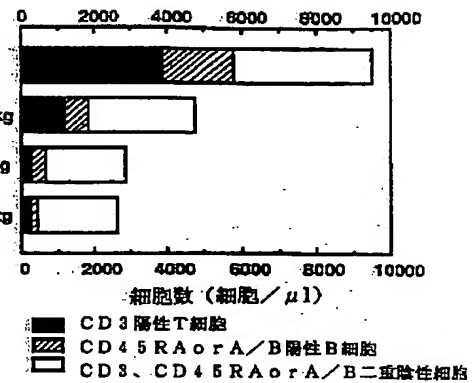
【図7】



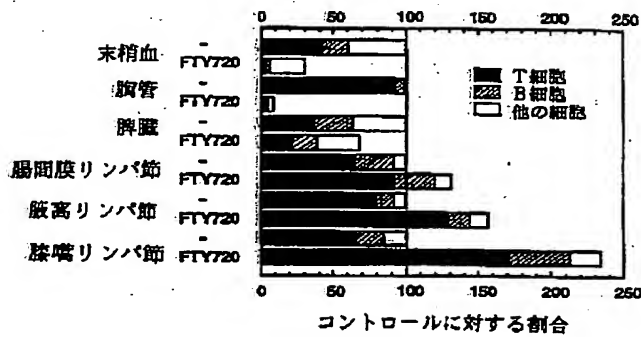
【図8】



【図11】

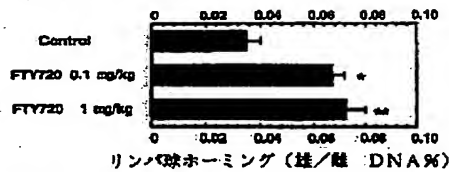


【図12】

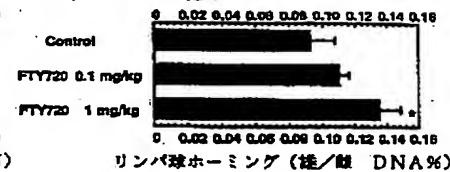


【図13】

末梢リンパ節



バイエル板



腸間膜リンパ節



脾臓

